第2卷第4期增刊　　动物学研究　　Vol.2, No.4
1981年11月　　ZOOLOGICAL RESEARCH　　Nov., 1981

广东蛇药对^{131}I标记的银环蛇毒在小白鼠膈肌含量的影响

吴秀荣 曾婉云 沈宝莲 陈克敏

（中山医学院药理学教研室）

广东蛇药《原名7118蛇药》对用LD90～100的银环蛇毒、眼镜蛇毒、眼镜王蛇毒及海蛇毒等作皮下注射及用LD50毒量的蝮蛇毒作蝮腔注射而受毒的小白鼠都有非常显著的保护作用($P<0.001$)[1]。临床验证中曾用于确诊为毒蛇咬伤的病人308例，其中仅2例蝮蛇伤用过抗蝮蛇毒血清。308例中确诊为银环蛇伤90例、金环蛇伤2例、眼镜蛇伤56例、蝮蛇伤101、青竹蛇伤30例及其他毒伤29例；除2例银环蛇伤及1例眼镜蛇伤死亡外其他全部治瘉；特别是9例银环蛇伤已呼吸停止者，在人工呼吸、适当补水盐、抗菌药等支持疗法下，单用广东蛇药灌胃、对已发生肠麻痺者加用此药注射剂，使7例病人获救，其有效自主呼吸平均在60小时恢复[2]。2例死亡病人中一例由于人工呼吸机障故未及时发现、一例由于心跳骤停时间超过五分钟最后由脑软化而死。因此我们认为无论在动物实验或临床验证的结果都有力地证明广东蛇药对以神经毒为主的毒蛇伤确有疗效。已知银环蛇毒中的α-Bungarotoxin对横纹肌终板N_2胆碱受体的阻断作用几乎是不可逆的[3～5]。一些资料证明正常大鼠膈肌终板胆碱受体的转换是缓慢的，其半衰期约7.5天[6]。从我们所获得的资料看来，似乎在某种条件下这种结合是可逆的，因而设计此试验。考虑到临床蛇伤病人及我们在整体动物中毒实验都是用银环蛇毒全毒，又根据GumAA氏等资料[7]证明用^{125}I标记蛇毒肌注于大白鼠体内，在各种组织中测得的放射活性是来源于标记蛇毒而不是游离I，为了统一前后工作实验条件因此用^{131}I标记银环蛇毒全毒作整体及离体膈肌试验，以研究广东蛇药对银环蛇毒神经毒在小鼠膈肌含量的影响。

材料和方法

广东蛇药

双目灵(*Passiflora Cochinchinensis* Spreng)全草和柚子叶(*Citrus Grandis* (L)Osbeck)，以2∶3比例混合，做成312%煎剂。

广东银环蛇毒

是本室于1972～73年采集，真空干燥后把由许多毒蛇收集到的蛇毒混合，研磨成十分均匀的粉剂，测定其LD50，放于燥器中保存。

^{131}I 标记的银环蛇毒

根据Shue氏等方法[8]标记，标记银环蛇毒由广东测试所协助提供。取计算量^{131}I（Na^{131}I）加入银环蛇毒磷酸缓冲液混匀，加入氯胺T(15mg/ml，0.1ml)，反应2分钟，加入偏重亚硫酸钠(45mg/ml 0.1ml)终止反应；加入KI(20mg/ml，0.2ml)后，放进预先经牛血清蛋白平衡过的Sephadex G25柱(1.1×20cm)进行纯化。每管收集1ml，以蛋白峰面积计算其标记率，得到标记蛋白^{131}I-Bungarus venom供使用，实验用的氯胺T，偏重亚硫酸钠及碘化钾等均用磷酸盐缓冲液pH7.4配制。实验用比度为127μCi/ml、20μg/0.1ml银环蛇毒，标记率为75.6%。

实 验 方 法

一、整体实验

用18～22克体重的健康小白鼠，雌雄在对照组与实验组的数目相等，体重的分布也相同，停食12小时，每天上午8时开始实验，用^{131}I标记银环蛇毒20μg/10g体重（即0.1ml）于一侧腹股沟皮下注射，对照组与用药组动物各随机抓取10个交叉注射。用药动物于给毒前以广东蛇药煎剂0.2ml/10g灌胃一次，对照组用等量蒸馏水（或盐水）灌胃；对照组动物多于注毒后两小时死亡，用药组多不死亡。

注射后两小时，当对照组死亡时迅速剖腹沿肋骨把膈肌剪下即洗去血液，放进20ml生理盐水中搅拌20秒，换液再洗共三次，即用滤纸吸干、称重，放进有塞试管中。在处理一个对照组动物时即用颈椎脱臼法处死同号用药组动物，迅速剪出膈肌与对照组完全相同的方法及条件处理。待同批动物（包括对照、用药组）膈肌都按同法处理毕，即于每个样本中加入过氯酸(AR)0.2ml后，加入30%过氧化氢0.4ml，在80°C水溶中消化10分钟，每个膈肌都完全消化。用国产FH-408型半自动定标器测定每个样本分钟脉冲数，取三次测量的平均值减去本底平均值，再以每个膈肌重（mg）除之，即得每分钟每毫克膈肌组织的脉冲数（cpm/mg）。

整体动物实验共做两批，其结果见表1。

二、离体实验

用健康成年小白鼠，颈椎脱臼法处死，立即剪下整个膈肌即放饱和氧台氏液中洗净血液，仍浸于室温饱和氧台氏液中备用。两批实验共用膈肌50个。第一批，对照组与用药组各用膈肌十个。对照组10个分别置于含20μg/ml^{131}I标记银环蛇毒饱和氧台氏液中浸泡一小时。用药组十个膈肌则分别置于含有20μg/ml银环蛇毒及0.2ml/ml广东蛇药注射剂（pH6.8）的饱和氧台氏液中浸泡一小时。然后所有膈肌都顺序按整体实验的方

法处理，其结果如表2。

第二批：分三组进行，每组十个膈肌，一组作对照，两组为用药组，用药组中一组按第一批实验方法处理，另一组则把膈肌先置蛇毒中浸泡一小时，然后取出浸入广东蛇药台氏液中一小时，其他条件与第一批相同，处理方法也一样，结果亦见表2。

表1　广东蛇药对^{131}I银环蛇毒在整体试验中小鼠膈肌分布的影响

批号	动物数	给毒量 (μg/10g Supc.)	给药量 (312% ml/10g per os)	膈肌平均放射活性 (cpm/mg)	P值
1					
对照组	10	20	0.2（盐水）	83±16.91	
用药组	10	20	0.2	51±13.05	<0.05
2					
对照组	10	20	0.2（盐水）	91±36.05*	
用药组	10	20	0.2	60±12.07	<0.05

〔注〕批号 1.是对照组与用药组给毒后两小时即用颈椎脱臼法把动物按注毒的先后次序处死立即剪出膈肌进行处理。

批号 2.是用毒后待对照组开始死亡时才剪膈肌在对照组中，有7个动物是在用毒后2小时内死亡，3个是在2°20′后仍未死，而被人工处死的。*自动死亡的动物膈肌平均放射活性为109 cpm/mg，而处死动物的膈肌平均放射活性为48.3cpm/mg。

表2　广东蛇药对^{131}I银环蛇毒在离体试验中小鼠膈肌分布的影响

批号	标本数	给毒浓度* (μg/ml)	给药浓度* (注射剂ml/ml)	膈肌平均放射活性 (cpm/mg)	P值
1					
对照组	10	20		2739±505.5	
用药组	10	20	0.2	1835±279.0	<0.001
2					
对照组	10	20		2796±482.0	
用药组(1)	10	20	0.2	1728±430.1	<0.001
用药组(2)	10	20	0.2	1373±331.7	<0.001

〔注〕*指台氏液中的最终浓度。

用药组（1）是毒与药同时放进台氏液中然后放入膈肌。

用药组（2）是把膈肌先放含毒台氏液中泡一小时后，取出再放入含蛇药的台氏液中泡一小时。

为了尽可能减少操作上差异，我们把各种实验操作分工专人负责，如吸毒液、注射毒、剪出膈肌、冲洗与吸干、称重、消化、计数等都由专人负责，既可统一操作，又可节省时间使全部实验在较短时间完成。

讨 论

根据整体与离体膈肌实验的结果证明广东蛇药确能显著地减少小鼠膈肌中^{131}I标记银环蛇毒的量。在整体的第二批实验中对照组膈肌脉冲数的均数标准差较大，原因是10个动物中7个在两小时左右中毒死亡的，其膈肌的放射活性都很高而3个在两小时三十分后未死而被处死的膈肌放射活性很低，前者的均数是后三个动物膈肌放射活性均数的2.3倍。从统计学数字看这实验结果不理想；但实际上也进一步说明用标记粗毒注入体内，由膈肌中测得的放射活性是来自保存了毒性的标记神经毒的，这与GumAA氏等所得的结果是一致的，也证明通过检测用毒后膈肌的放射活性高低，可以作为研究广东蛇药作用的一个指标。

在整体实验中由于我们应用的毒量较大，动物多在较短的时间内死亡，而蛇药是采用灌胃的方法，为了使蛇药能来得及起作用，一般我们多于注毒前二十分钟一次灌胃，在两批的实验中虽然已证明对照组与用药组的差异是显著的（$P<0.05$），为了排除这时间上的差异，我们用离体的膈肌标本做实验，把蛇毒与蛇药同时溶在饱和氧台氏液中，或甚至使标本先放在蛇毒浸一小时后再用蛇药，同样看到用药组膈肌中^{131}I标记银环毒放射活性（cpm/mg）比对照组显著减低（$P<0.001$）。这进一步说明即使蛇毒中毒后用广东蛇药仍能起作用。

根据文献资料银环蛇毒的α-Bungarotoxin需要占领85%以上的终板受体时才出现明显的阻断作用[9]。我们的临床银环蛇伤呼吸已停止的病人，他们不但呼吸停止而且全身肌肉瘫痪，应该可以推想他们呼吸肌终板的胆碱受体绝大部分已被蛇毒所占据，留下的预备受体是不多的，但在那被救活的病人中除一例经过173小时才恢复呼吸外，其他6例平均在39小时(最短24小时，最长56小时)有效自主呼吸恢复。在病人呼吸完全停止，靠人工呼吸来维持生命的条件下是否能在24小时内再生足够的胆碱受体，使病人的自主呼吸恢复？根据我们实验室及临床材料看来可能性较少，再从目前用^{131}I标记蛇毒的研究结果，我们认为广东蛇药可能是通过与α-Bungarotoxin争夺终板的N_2胆碱受体，或促进α-Bungarotoxin受体结合物的离解。在我们对广东蛇药成分分析的研究工作中，我们发现此药的有效注射剂或煎剂（浸膏）中都含有较多的钾离子，认为通过较多的钾离子作用能促使毒与受体结合物离解而使原受体的功能恢复的可能性是很大的。我们准备用电鳐电器官的受体为工具，进一步研究神经毒与广东蛇药总成分及分离出的各种成分在膜受体或游离受体中的相互作用。

结 论

整体实验中先以广东蛇药的最大耐受量于用毒前20分钟灌胃一次，后用^{131}I标记的银环蛇毒20μg/10g皮下注射于小白鼠，2小时后取出其膈肌处理，检测其放射活性，证明用药组比对照组为低，$P<0.05$；离体膈肌实验中以广东蛇药(0.2ml注射剂/ml台氏液）及^{131}I标记银环蛇毒（20μg/ml）同时作用于离体膈肌（一小时）；或先用同一浓

度的蛇毒先浸膈肌一小时然后再用同一浓度蛇药泡一小时后才冲洗、处理，结果用药组膈肌的放射活性都比对照组为低，两种方法的结果用药组与对照组的差异都是非常显著的，$P<0.001$。

参 考 文 献

〔1〕中山医学院：广东蛇药鉴定资料汇编，1977，100～105页。

〔2〕中山医学院：广东蛇药鉴定资料汇编，1977，65页。

〔3〕Chang, C. C. and Lee, C. Y. *Arch int. pharmacodyn*, 1963, 144（1—2），241.

〔4〕Hartzell, H. C. and Fambrough, D. M. Acetycholine receptor production and incorporation into membranes of developing muscle fibers. *Develop. Biol.* 1973, 30, 153.

〔5〕Fambrough, D.M. Neurochemistry of cholinergic receptors, *An American society for neurochemistry monograph*, 1974, Raven, New York, pp 85—113.

〔6〕Chang, C.C. and Huang, M. C. Turnover of junctional and estrajunctional acetylcholine receptors of the rat diaphragm. *Nature* 1975, 253, 643.

〔7〕Gumaa, K. A. et al. Distribution of I¹²⁵-labelled *Bitis arietans* venom in the rat. *Toxicon*, 1974, 12, 565.

〔8〕Shü, I. C. et al. *Toxicon*, Study on I¹³¹-labelled cobrotoxin. 1968, 5, 295.

〔9〕Chang, C. C. et al. Effects of chronic treatment with various neuromuscular blocking agents on the number and distribution of acetylcholine receptors in the rat diaphragm. *J. physiol. London*, 1975, 250, 161.

〔10〕中山医学院药理研究室：待发表。

志谢：本实验承广东测试所协助标记蛇毒及本院同位素实验室提供实验条件，余惠文、徐钟沅、桂怡宁等同志对实验技术予指导，特此致谢。

THE INFLUENCE OF GUANGDONG SNAKEBITE DRUG ON THE DISTRIBUTION OF ^{131}I LABELLED *BUNGARUS MULTICINCTUS* VENOM IN THE MICE DIAPHRAGMS

Wu Xiu-rong Zeng Wan-yun Shen Bao-lian Chen Ke-min
(Department of pharmacology, Zhongshan medical college)

Abstract

Guangdong Snakebite Drug (GSD) is a drug formula consisting of two herbs; *Passiflora cochinchinensis* Spreng and *Citrus grandis* (*L*) Osbeck. From our previous experiments (1971—1976) in mice and in clinical trials, the drug proved to be highly effective in treating various snake venoms intoxication.

Experiments in 1977 showed that using ^{131}I-*Bungarus multicinctus* venom (*in vitro* and *in vivo*), the average radioactivity in the diaphragms of the control mouse groups was significantly higher than that of the drug-treated groups ($P<0.001$ and <0.05). *Our results suggest that* GSD *can promote the* release of ^{131}I-Bungarotoxin from the cholinoreceptor in the endplates of striated muscles.